วิธีการทดลอง

1. วิธีการหา Total Carbohydrates ในน้ำมะพร้าว และกากน้ำตาล ใช้วิธี The Phenol-Sulfuric acid method (18) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้คือ

1.1 การทำ calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน D-glucose

1.1.1 ดูดสารละลายน้ำตาล D-glucose จำนวน 2 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครกรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 x 160 มิลลิเมตร

1.1.2 ใส่สารละลาย phenol 5 % 1 มิลลิลิตร

1.1.3 ใส่ H_2SO_4 95.5 % ถ.พ. 1.84 5 มิลลิลิตร

1.1.4 ปั่นด้วย rotamixer นาน 30 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้จนครบ 10 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 15 นาที

1.1.5 นำไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง Spectronic 20 ที่ความยาวคลื่น 490 nm

1.1.6 สร้าง calibration curve ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของน้ำตาล (ไมโครกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร)

ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 1 และรูปที่ 1

1.2 การวิเคราะห์หา Total Carbohydrates ในน้ำมะพร้าวและกากน้ำตาลโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

น้ำมะพร้าวที่จะวิเคราะห์ต้องทำให้เจือจางโดยวิธี two fold dilution จนถึง 1:2048 สำหรับกากน้ำตาลทำให้เจือจางก่อนโดยนำสารละลายกากน้ำตาลความเข้มข้น 1:10 มาทำให้เจือจางโดยวิธี two fold dilution จนถึง

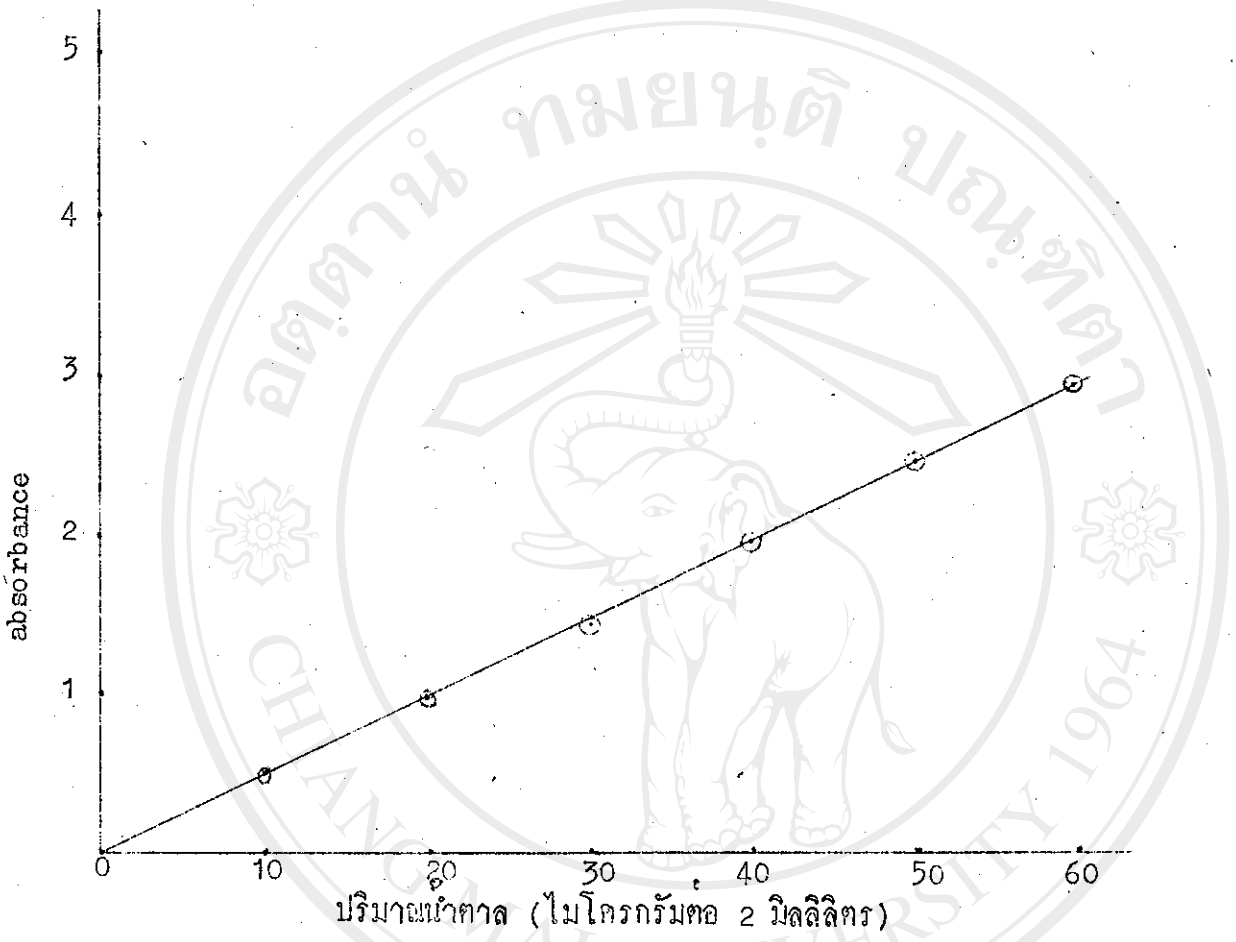
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 ค่า absorbance ของสารละลายมาตรฐานน้ำตาล D-glucose โดยเครื่อง Spectronic 20 ที่ความยาวคลื่น 490 nm

ความเข้มข้นของสารละลาย D-glucose (ไมโครกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร)	absorbance*
0	0
10	0.046
20	0.090
30	1.400
40	1.900
50	2.370
60	2.850

* ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย D-glucose ปริมาณต่าง ๆ กัน โดยวิธี The Phenol-Sulfuric method ด้วยเครื่อง Spectronic 20 ที่ความยาวคลื่น 490 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1:81920 ในการวิเคราะห์ใช้ค่า dilution 2 dilution สุดท้าย หลังจากนั้นดูดสารละลายแต่ละ dilution มา 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบขนาด 16 x160 มิลลิเมตร ต่อจากนั้นปฏิบัติตามข้อ 1.1.2 จนถึงข้อ 1.1.5

2. วิธีการหา Total Nitrogen ในน้ำมะพร้าวและกากน้ำตาล ใช้วิธี Kjeldahl method ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้คือ

1. การย่อยตัวอย่าง (Digestion)

1.1 ชั่งตัวอย่าง 0.7-3.5 กรัม (ใช้น้ำมะพร้าว 10 และกากน้ำตาล 1 มิลลิลิตร) ใส่ใน Kjeldahl digestion flask

1.2 เติม H_2SO_4 95.5 % 30 มิลลิลิตร และใส่ Salicylic acid 1 กรัม ตั้งทิ้งไว้นานประมาณ 30 นาที โดยเขย่าขวดบ่อย ๆ

1.3 เติม Zinc dust ลงไปทีละน้อยจำนวน 2 กรัม

1.4 นำไปย่อยโดยใช้อุณหภูมิต่ำ ๆ ประมาณ 50°C จนไอระเหยออกจากฟองที่เดือดหมดไป แล้วจึงเพิ่มให้อุณหภูมิสูงขึ้นให้เดือด แล้วต้มต่อไปจนไอสีขาว ๆ หมดไป ใช้เวลาประมาณ 10 นาที

1.5 เติม HgO ลงไป 0.7 กรัม ต้มไปจนตัวอย่างปราศจากสี (ถ้าตัวอย่างเกือบแห้งให้เติม H_2SO_4 ลงไปอีก 10 มิลลิลิตร)

2. การกลั่นตัวอย่างที่ย่อยแล้ว (Distillation)

2.1 นำ flask ที่ใส่สารละลายมาตรฐาน 0.1 N.H_2SO_4 50 มิลลิลิตร วางลงบนแท่นรองรับ จัดให้ปลายท่อของกรวยจุ่มอยู่ใต้ระดับผิวของกรด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 เทตัวอย่างที่ย่อยแล้วลงในเครื่องทางกรวยเติมตัวอย่าง (Filling Funnel) แล้วเทสารละลาย NaOH 45 % ลงไป 50 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นล้างให้สะอาด (ประมาณ 80-100 มิลลิลิตร)

2.3 distillate 150 มิลลิลิตร แรกที่กลั่นได้จะเป็น NH_3

2.4 เมื่อการกลั่นสิ้นสุดลงลองทดสอบได้โดยหยด Methyl red ให้ไหลลงไปผสมกับ distillate ที่ปลายท่อ condenser ถ้ายังเกิดสีเหลืองแสดงว่ายังมี NH_3 กลั่นตัวออกมาอีก ต้องกลั่นต่อไปอีก

2.5 เมื่อสิ้นสุดการกลั่นแล้วนำเอา flask ที่รองรับ distillate ออกไปแล้วล้าง condenser ด้วยน้ำกลั่น

3. การทำ Titration

นำตัวอย่างที่กลั่นได้ เติมสารละลายมาตรฐาน 0.1 N.H_2SO_4 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปติเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 N.NaOH โดยใช้ Methyl red เป็น indicator เพื่อหาจำนวนสารละลายมาตรฐาน 0.1 N. H_2SO_4 ที่ทำปฏิกริยาพอดีกับ NH_3 ที่กลั่นตัวออกมา คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์โดยถือว่า 1 มิลลิลิตร ของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N. H_2SO_4 จะสมมูลย์กับ 1.401 มิลลิกรัม ของไนโตรเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การเพาะเลี้ยง และเตรียมยีสต์เพื่อใช้ในการทดลอง

1. การศึกษาการเจริญของยีสต์ Saccharomyces sp. CMU$_1$ และ Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus

ในการศึกษานี้ได้กระทำในขวดเขย่า (shake flask) โดยถ่ายเชื้อยีสต์ที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ จาก Sabouraud agar plate 1 โคโลนี ใส่ในหลอดทดสอบที่มีอาหารน้ำมะพร้าว มีน้ำตาล 10 Brix เติม K_2HPO_4 0.5 % $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 % pH 4.5 จำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยง 30 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายเชื้อยีสต์จากหลอดทดสอบ 10 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ที่มีอาหารเหมือนเดิมทุกประการ จำนวน 300 มิลลิลิตร นำไปวางในเครื่องเขย่า (shaker) หลังจากนั้นใช้ sterile pipette ดูดสารละลายยีสต์ใน flask 5 มิลลิลิตร มาทำให้เจือจางด้วยอาหารที่ใช้เป็น blank 5 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง Spectronic 20 ทุก ๆ 3 ชั่วโมง โดยเริ่มจากเวลาที่ 0 ชั่วโมง จนถึง 30 ชั่วโมง และใช้อาหารชนิดเดียวกันเป็น blank ในการวัดทุกครั้ง

ผลการศึกษาได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 และรูปที่ 2 และ 3

2. การเตรียมเชื้อยีสต์เริ่มต้น (starter)

ถ่ายเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ จาก Sabouraud agar plate 1 โคโลนี ใส่ในหลอดทดสอบที่มีอาหารน้ำมะพร้าวมีน้ำตาล 10 Brix เติม K_2HPO_4 0.5 % $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 % pH 4.5 จำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่ 30 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายเชื้อจากหลอดทดสอบ 1 มิลลิลิตร ด้วย sterile pipette ใส่ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่ใส่อาหารชนิดเดียวกัน 20 มิลลิลิตร นำไปตั้งไว้บนเครื่องเขย่า โดยใช้เวลาในการเขย่านาน 21 ชั่วโมง สำหรับ

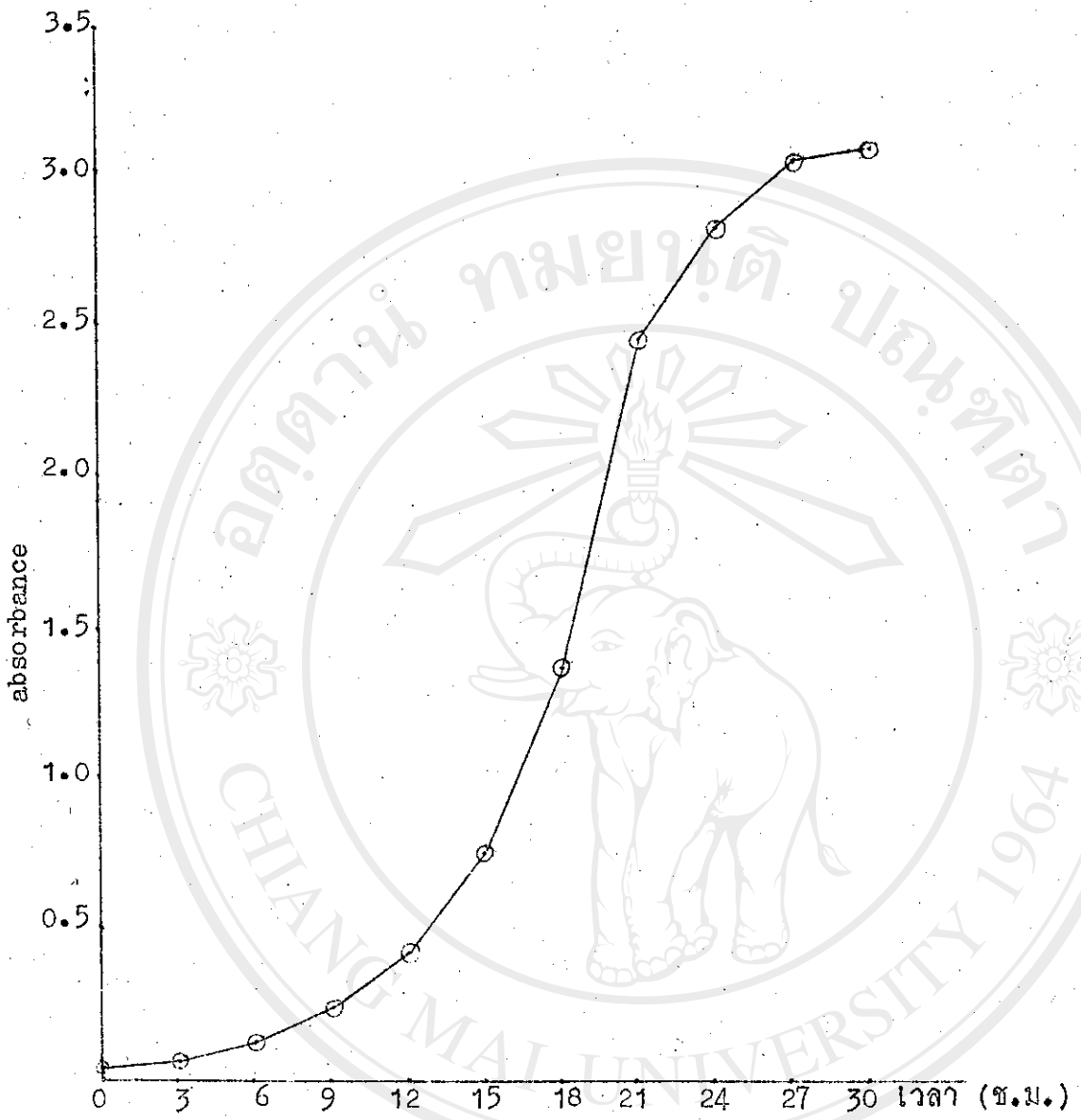
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 ค่า absorbance ของการเจริญของยีสต์ Saccharomyces sp. CMU_1 และ Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus ในเวลาต่าง ๆ กัน ในอาหารน้ำมะพร้าวมีน้ำตาล 10 Brix pH 4.5 เติม K_2HPO_4 0.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 % ในขวดเขย่าโดยเครื่อง Spectronic 20 ที่ความยาวคลื่น 500 nm

เวลา (ชั่วโมง)	absorbance*	
	Saccharomyces sp.CMU_1	Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus
0	0.04	0.05
3	0.063	0.127
6	0.123	0.223
9	0.225	0.350
12	0.425	0.500
15	0.750	0.900
18	1.380	1.380
21	2.450	2.250
24	2.860	2.750
27	3.00	2.880
30	3.15	3.05
blank	0.00	0.00

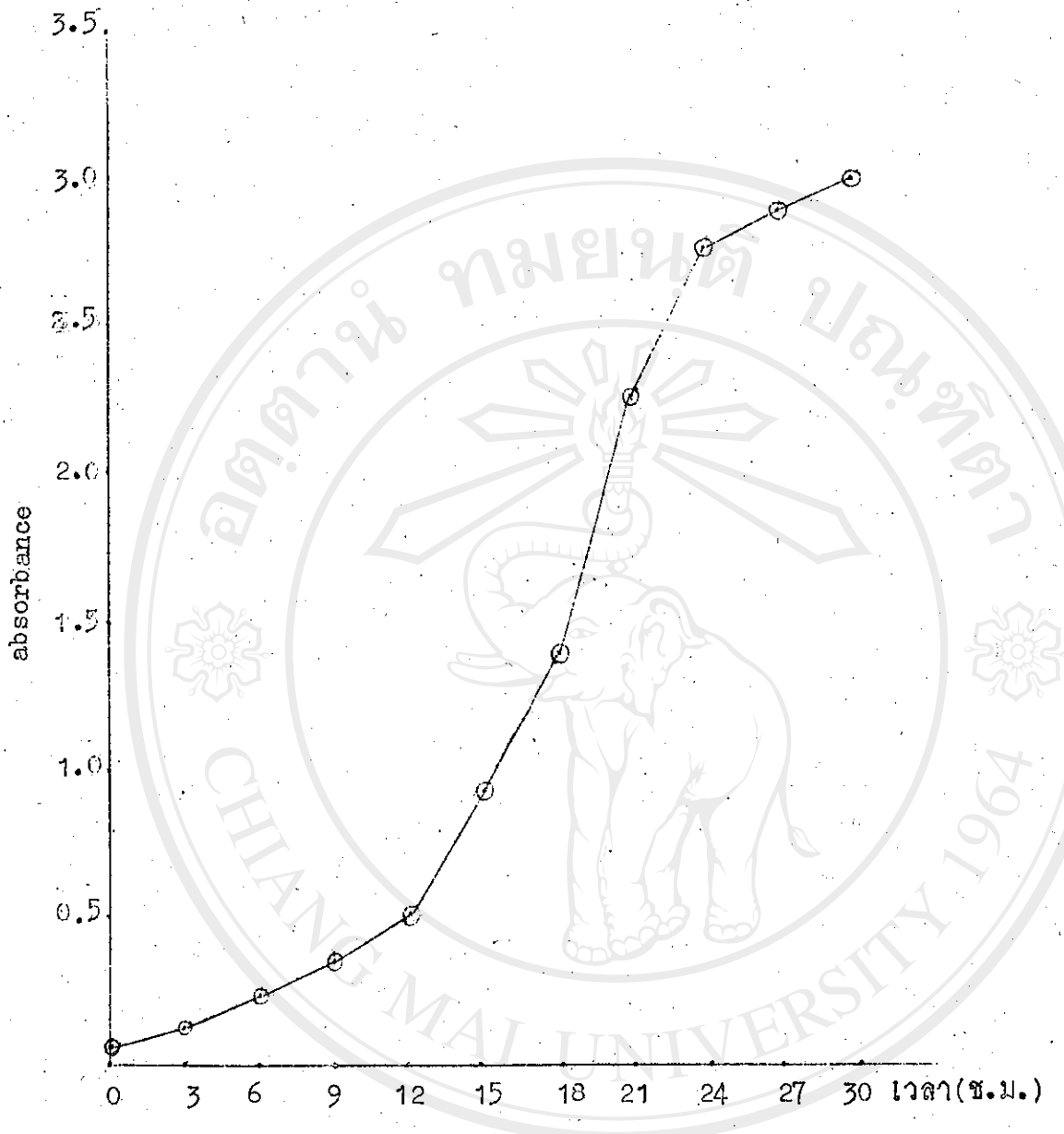
*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 2 การเจริญของ Saccharomyces sp. CMU$_1$ ในอาหารน้ำมะพร้าว มีน้ำตาล 10 Brix pH 4.5 เติม K_2HPO_4 0.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 % ในขวดเขย่า แสดงออกมาเป็นค่า absorbance โดยเครื่อง Spectronic 20 ที่ความยาวคลื่น 500 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3 การเจริญของ Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus ในอาหารน้ำมะพร้าว มีน้ำตาล 10 Brix pH 4.5 เติม K_2HPO_4 0.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 % ในขวดเขย่า แสดงออกมาเป็นค่า absorbance โดยเครื่อง Spectronic 20 ที่ความยาวคลื่น 500 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Saccharomyces sp. CMU_1 และ 22 ชั่วโมง 30 นาที สำหรับ Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมัก ethanol

4. การเตรียมน้ำมะพร้าวในการหมักแอลกอฮอล์

1. น้ำมะพร้าวที่มีน้ำตาล 14 %

นำน้ำมะพร้าวที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบางจำนวน 3800 มิลลิลิตร เติมกากน้ำตาลลงไป 1200 มิลลิลิตร จากนั้นปรับให้มีปริมาณน้ำตาล 19.3 Brix แล้วเติม K_2HPO_4 0.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 % ปรับให้ pH ของสารละลายเท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซิตริก

2. น้ำมะพร้าวที่มีน้ำตาล 16 %

นำน้ำมะพร้าวที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบางจำนวน 3612 มิลลิลิตร เติมกากน้ำตาลลงไป 1379 มิลลิลิตร จากนั้นปรับให้มีปริมาณน้ำตาล 22.1 Brix แล้วเติม K_2HPO_4 0.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 % ปรับให้ pH ของสารละลายเท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซิตริก

3. น้ำมะพร้าวที่มีน้ำตาล 18 %

นำน้ำมะพร้าวที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบางจำนวน 3449 มิลลิลิตร เติมกากน้ำตาลลงไป 1551 มิลลิลิตร จากนั้นปรับให้มีปริมาณน้ำตาล 24.8 Brix แล้วเติม K_2HPO_4 0.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 % ปรับให้ pH ของสารละลายเท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซิตริก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. น้ำมะพร้าวที่มีน้ำตาล 20 %

นำน้ำมะพร้าวที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบางจำนวน 3276 มิลลิลิตร เติมกากน้ำตาลลงไป 1724 มิลลิลิตร จากนั้นปรับให้มีปริมาณน้ำตาล 27.6 Brix แล้วเติม K_2HPO_4 0.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 % ปรับให้ pH ของสารละลายเท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซิตริก

5. น้ำมะพร้าวที่มีน้ำตาล 22 %

นำน้ำมะพร้าวที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบางจำนวน 3104 มิลลิลิตร เติมกากน้ำตาลลงไป 1896 มิลลิลิตร จากนั้นปรับให้มีปริมาณน้ำตาล 30.4 Brix แล้วเติม K_2HPO_4 0.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 % ปรับให้ pH ของสารละลายเท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซิตริก

5. การทำ Calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน ethanol

1. ตวง absolute ethanol 100 มิลลิลิตร ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เทใส่ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ก็จะได้สารละลายมาตรฐาน ethanol 20 % โดยปริมาตร
2. ดูดสารละลาย ethanol 20 % 380 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 19 %
3. ดูดสารละลาย ethanol 19 % 378.8 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 21.2 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 18 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ดูดสารละลาย ethanol 18 % 377.7 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 22.3 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 17 %

5. ดูดสารละลาย ethanol 17 % 376.47 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 23.53 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 16 %

6. ดูดสารละลาย ethanol 16 % 375 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 25.0 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 15 %

7. ดูดสารละลาย ethanol 15 % 373.3 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 26.7 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 14 %

8. ดูดสารละลาย ethanol 14 % 371.4 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 28.6 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 13 %

9. ดูดสารละลาย ethanol 13 % 369.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 30.8 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 12 %

10. ดูดสารละลาย ethanol 12 % 366.67 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 33.33 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 11 %

11. ดูดสารละลาย ethanol 11 % 363.6 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น จะได้สารละลาย ethanol 10 %

12. ดูดสารละลาย ethanol 10 % 360 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 9 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

13. ดูดสารละลาย ethanol 9 % 355.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 44.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 8 %

14. ดูดสารละลาย ethanol 8 % 350 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 7 %

15. ดูดสารละลาย ethanol 7 % 342.85 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 57.15 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 6 %

16. ดูดสารละลาย ethanol 6 % 333.33 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 66.67 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 5 %

17. ดูดสารละลาย ethanol 5 % 320 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 4 %

18. ดูดสารละลาย ethanol 4 % 300 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 3 %

19. ดูดสารละลาย ethanol 3 % 266.67 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 133.33 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ethanol 2 %

20. ดูดสารละลาย ethanol 2 % 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มี ethanol 1 %

นำสารละลายที่มี ethanol ตั้งแต่ 0-20 % ใส่ลงในหลอดทดสอบขนาดใหญ่ หลอดละ 20 มิลลิลิตร เท่ากันทุกหลอด ปิดด้วยจุกยาง แล้วนำไปใส่ในตู้เย็น นาน 30 นาที พร้อมด้วย refractometer แล้วปรับให้อุณหภูมิของสารละลายเท่ากับ 20°C นำมาวัดค่าดัชนีหักเหของแสง (refractive index)

ผลแสดงไว้ในตารางที่ 3 และรูปที่ 4

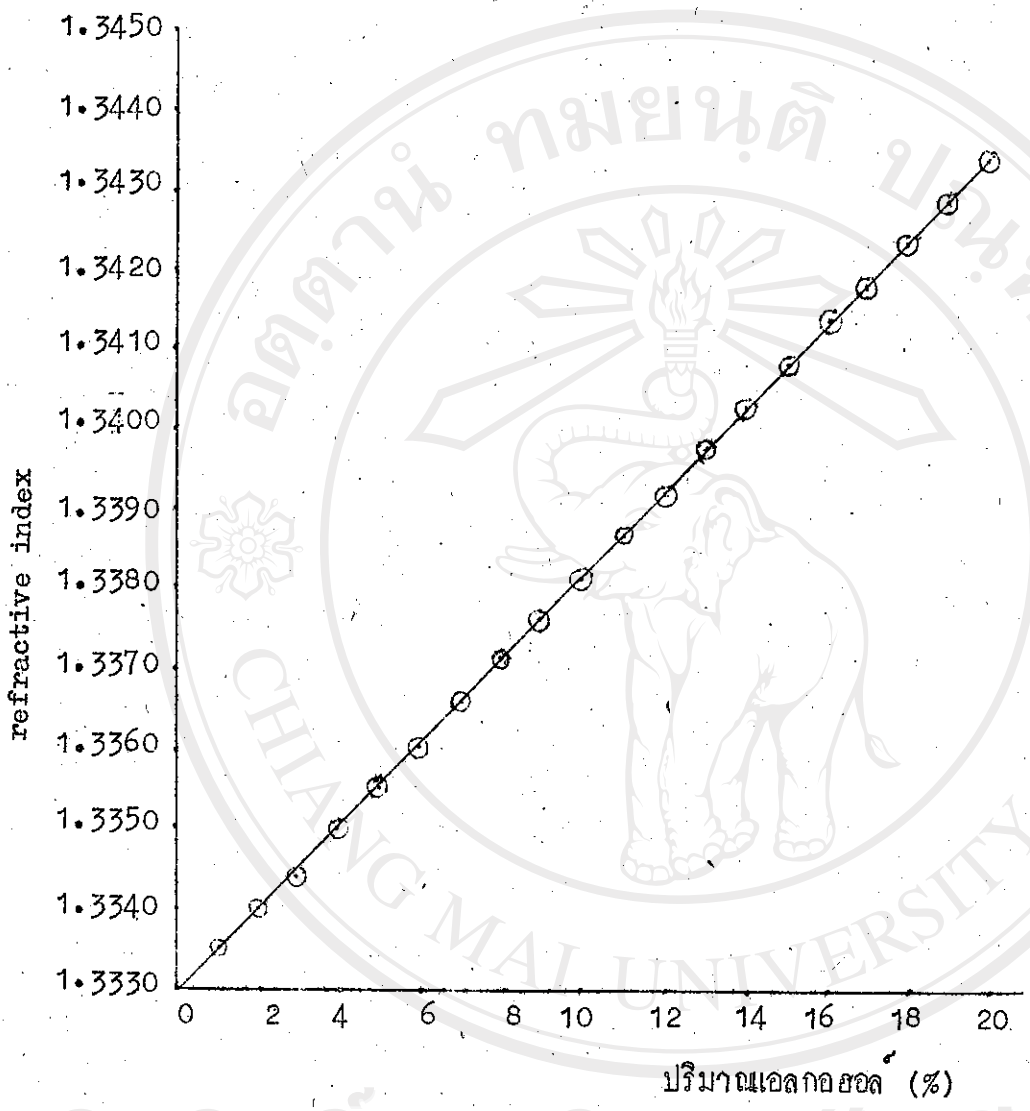
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 ค่าดัชนีหักเหของแสง (refractive index) ของสารละลายมาตรฐานที่มี ethanol 0-20 % โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 20 °C โดย refractometer ที่ทำจากบริษัท Atago Optical Works ประเทศญี่ปุ่น มี scale 1.3330-1.3560

ปริมาตร ethanol (%)	ค่าดัชนีหักเหของแสง*	ปริมาตร ethanol (%)	ค่าดัชนีหักเหของแสง*
0	1.3330	11	1.3387
1	1.3335	12	1.3392
2	1.3340	13	1.3398
3	1.3344	14	1.3403
4	1.3350	15	1.3409
5	1.3355	16	1.3414
6	1.3360	17	1.3418
7	1.3366	18	1.3424
8	1.3371	19	1.3429
9	1.3376	20	1.3434
10	1.3381		

* ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 5 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 4 กราฟค่าดัชนีหักเหของแสง (refractive index) ของสารละลายมาตรฐานที่มี ethanol 0–20 % (โดยปริมาตร) โดยเครื่อง refactometer ของบริษัท Atago Optical Works ประเทศญี่ปุ่น scale 1.3330–1.3560

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การเพาะเลี้ยง และการเตรียมบักเตรีเพื่อใช้ในการทดลอง

1. การศึกษาการเจริญของ Acetobacter aceti

ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30°c โดยถ่ายเชื้อ Acetobacter aceti ที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ จากอาหารที่ประกอบด้วย yeast extract 3 %, agar 2 %, glucose 10 % (15) ใส่ลงใน flask น้ำส่าขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี ethanol 4 %, K_2HPO_4 0.5 % pH 4.0 (2, 7, 26) จำนวน 50 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงไว้นาน 24 ชั่วโมง แล้วดูดเชื้อบักเตรีใน flask 20 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่ใส่อาหารเหมือนเดิมทุกประการจำนวน 400 มิลลิลิตร ให้อากาศในอัตรา 0.5 VVM ที่อุณหภูมิ 30°c หลังจากนั้นดูดสารละลายของเชื้อบักเตรีใน flask 5 มิลลิลิตร มาทำให้เจือจางด้วยอาหารที่ใช้เป็น blank 5 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปวัดหาค่า absorbance ด้วยเครื่อง Spectronic 20 ทุก ๆ 3 ชั่วโมง โดยเริ่มจากเวลาที่ 0 ชั่วโมง จนถึง 51 ชั่วโมง และใช้อาหารชนิดเดียวกันเป็น blank ในการวัดทุกครั้ง (VVM หมายถึงปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที)

ผลการศึกษาได้แสดงไว้ในตารางที่ 4 และรูปที่ 5

2. การเตรียมเชื้อบักเตรีเริ่มต้น (starter)

ถ่ายเชื้อบักเตรีที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ จากอาหารแข็งใส่ลงใน flask น้ำส่าขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี ethanol 4 % เติม K_2HPO_4 0.5 % pH 4.0 จำนวน 50 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°c นาน 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ20 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask ขนาด1000 มิลลิลิตร ที่มีอาหารอยู่ 400 มิลลิลิตร ให้อากาศ 0.5 VVM ด้วยเครื่อง air pump ตามตู้เลี้ยงปลาโดยทั่ว ๆ ไป (ซึ่ง 1 เครื่องจะให้อากาศออกมา

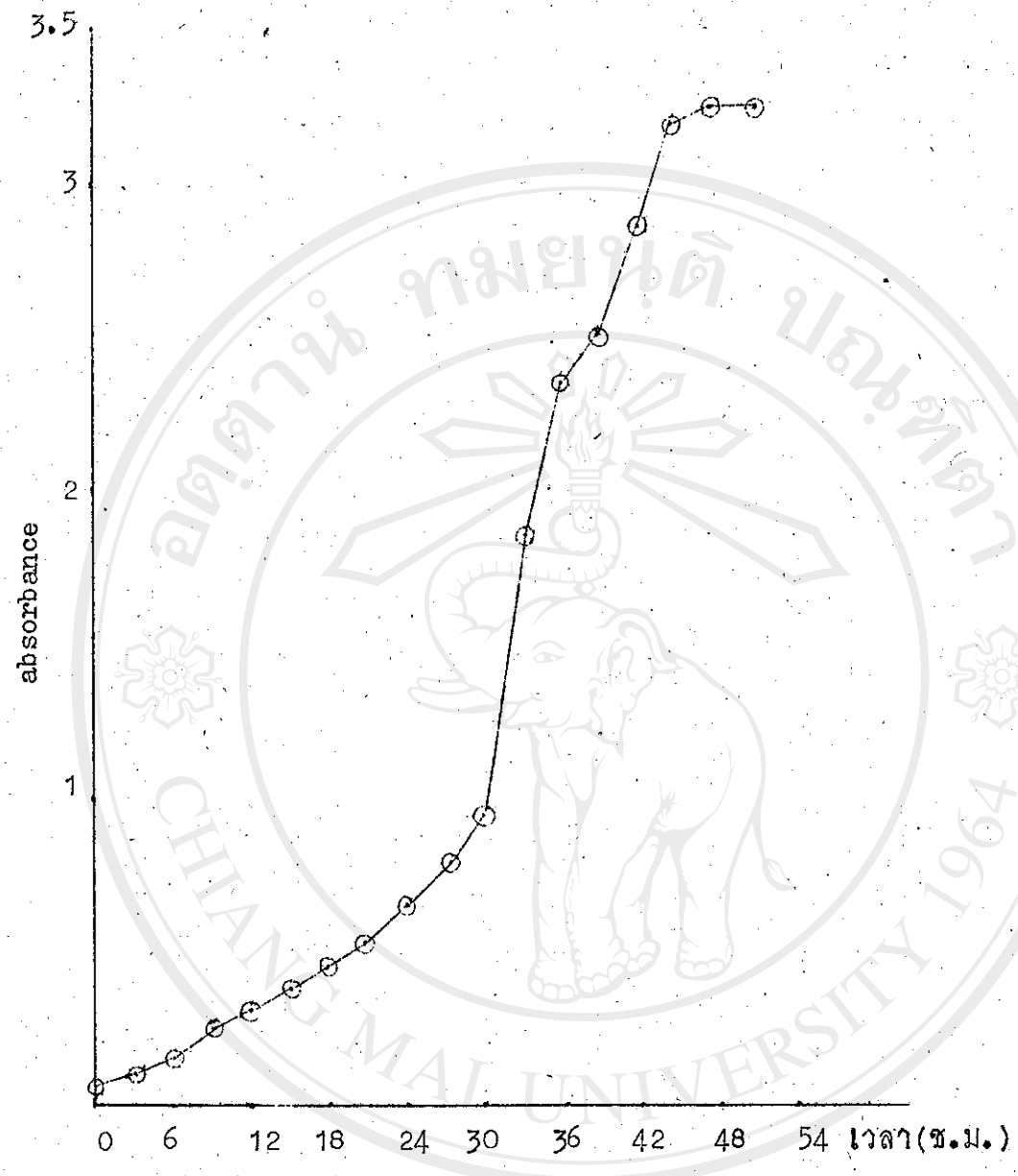
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 ค่า absorbance ของการเจริญ Acetobacter aceti ในน้ำส่าที่มี ethanol 4 % เติม K_2HPO_4 0.5 % pH 4.0 ให้อากาศ 0.5 VVM อุณหภูมิ 30°C โดยเครื่อง Spectronic 20 ที่ความยาวคลื่น 500 nm

เวลา (ชั่วโมง)	ค่า absorbance*	เวลา (ชั่วโมง)	ค่า absorbance*
0	0.075	27	0.79
3	0.10	30	0.95
6	0.15	33	1.85
9	0.25	36	2.35
12	0.30	39	2.50
15	0.38	42	2.87
18	0.45	45	3.20
21	0.53	48	3.25
24	0.65	51	3.24
		blank	0.00

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 5 การเจริญของ Acetobacter aceti ในน้ำส่าที่มี ethanol 4 % เติม K_2HPO_4 0.5 % pH 4.0 ให้อากาศ 0.5 VVM ที่อุณหภูมิ 30°C แสดงออกมาเป็นค่า absorbance โดยเครื่อง Spectronic 20 ที่ความยาวคลื่น 500 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นาทีละ 200 มิลลิลิตร) อุณหภูมิ 30°C นาน 40 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการศึกษาการหมักน้ำส้มสายชู

7. การเตรียมน้ำส่าเพื่อใช้ในการหมักน้ำส้มสายชู

โดยหมักแอลกอฮอล์จากน้ำมะพร้าวที่มีปริมาณน้ำตาล 20 % เติม K_2HPO_4 0.5 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 % pH 4.5 โดยใช้เชื้อยีสต์ Saccharomyces sp. CMU_1 เริ่มต้น 10 % ใช้เวลาในการหมัก 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30°C หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยแช่ใน water bath อุณหภูมิ 60-65°C นาน 30-40 นาที ก่อนการหมักน้ำส้มสายชู เติม sterile K_2HPO_4 0.5 % ลงไป และปรับให้น้ำส่ามีปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นหลังจากใส่เชื้อบักเตรีเริ่มต้นลงไปในปริมาณต่าง ๆ กัน เท่ากับ 11.26 % ด้วย absolute ethanol

8. การกลั่นน้ำส่า

ตวงน้ำส่า 100 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นซึ่งมีประสิทธิภาพในการกลั่น 96.67 % ให้ได้ปริมาตร distillate 100 มิลลิลิตร ใน volumetric flask

9. วิธีการติเตรดหาเปอร์เซ็นต์กรดน้ำส้ม

ใช้ปิเปต 1 มิลลิลิตร ดูดน้ำส้มสายชู 1 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 49 มิลลิลิตร หยด phenolphthalein ลงไป 3 หยด เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปติเตรดด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 N. NaOH อ่านค่าจำนวน 0.1 N. NaOH ที่ใช้แล้วนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์กรดน้ำส้มที่ได้ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

N_1 = จำนวน normality ของสารละลาย NaOH = 0.1

V_1 = จำนวนปริมาตรของ 0.1 N. NaOH ที่ใช้ไป

N_2 = จำนวน normality ของสารละลายกรดน้ำส้มในน้ำส่า

V_2 = จำนวนปริมาตรของน้ำส่าที่ใช้ 1.0 มิลลิลิตร

เมื่อหาบ normality ของกรดน้ำส้มแล้ว สมมติว่า X

จากสูตรโมเลกุลของกรดน้ำส้ม CH_3COOH มีน้ำหนักโมเลกุล = 60,

valency ของอนุมูลกรด = 1

นั่นคือ สมมูลย์ของกรดน้ำส้ม $= \frac{\text{น้ำหนักโมเลกุลของกรดน้ำส้ม}}{\text{valency ของอนุมูลกรด}}$

$= 60$

แสดงว่าใน 1000 มิลลิลิตร 1 normality มีเนื้อกรดน้ำส้มอยู่ = 60 กรัม

1000 มิลลิลิตร X normality มีเนื้อกรดน้ำส้มอยู่ = 60 กรัม

100 มิลลิลิตร X normality มีเนื้อกรดน้ำส้มอยู่ $= \frac{60\ X}{100}$ กรัม

$= 0.6X$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved